

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2005年8月18日(18.08.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/074892 A1

(51) 国际分类号⁷: A61K 9/127, 38/21, A61P 31/12

(21) 国际申请号: PCT/CN2004/000803

(22) 国际申请日: 2004年7月13日(13.07.2004)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200410015169.0 2004年1月16日(16.01.2004) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 深圳市海王英特龙生物技术股份有限公司(SHENZHEN NEPTUNUS INTERLONG BIO-TECHNIQUE HOLDINGS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南油大道海王大厦A座24层, Guangdong 518054 (CN).

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 王妍(WANG, Yan) [CN/CN]; 柴向东(CHAI, Xiangdong) [CN/CN]; 李云富(LI, Yunfu) [CN/CN]; 董保科(DONG, Baoke) [CN/CN]; 张雪涛(ZHANG, Xuetao) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南油大道海王大厦A座24层, Guangdong 518054 (CN).

(74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司(LECOMTE INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区知春路23号量子银座306室, Beijing 518057 (CN).

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

— 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
— 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: THE CREAM CONTAINING INTERFERON LIPOSOME

(54) 发明名称: 干扰素脂质体乳膏

(57) Abstract: The invention relates to a cream containing interferon liposome, which comprises the components as follows: the interferon that be encapsulated in the liposome; and the matrix of the cream. The advantages of the inventive interferon-containing liposome is high encapsulation ratio, good stabilization of manufacture, good uniformity, stable pharmacologic effects, and low leakage ratio. It can enhance the encapsulation of the liposome and increase the activity of the interferon and the pharmacodynamics by formulating the interferon liposome and the matrix into cream. It can treat the dermal diseases caused by virus infection, such as herpes zoster, herpetic stomatitis, wart, acute condyloma, infection molluscum, aedea herpes, flat wart, common wart, genital ulcer, aphtha and itching and the like.

(57) 摘要

本发明涉及含干扰素脂质体的乳膏剂, 包含下述组分: 包封于脂质体中的干扰素; 以及乳膏基质。本发明脂质体包封的干扰素, 它具有包封率高, 且制剂工艺稳定, 制品均一性好, 药效稳定, 泄露率低的优点。采用干扰素脂质体与基质制备成乳膏剂型, 能够提高脂质体包封性, 提高干扰素活性和药效。可治疗由病毒感染引起的皮肤病, 如带状疱疹、疱疹性口炎、疣、尖锐湿疣、染性软疣、外生殖器疱疹、扁平疣、寻常疣、生殖器溃疡、口疮及瘙痒等。

干扰素脂质体乳膏

技术领域

本发明涉及干扰素的一种新剂型，具体地说涉及含干扰素脂质体的乳膏剂。

背景技术

干扰素作为抗病毒、抗增殖和免疫调节药物已广泛使用，采用的剂型主要是针剂和外用剂型。外用型的干扰素可以直接作用于病灶部位，使用方便。但在应用过程中发现需要解决干扰素的活性保持和透皮吸收的问题。为了保持干扰素生物学活性的稳定，并改善干扰素的透皮吸收，达到治疗目的，较好的方式就是采用脂质体将干扰素包封，再制备相应的外用剂型。但现有技术中，采用脂质体包封的干扰素存在着许多的不足。如国外文献仅报道有脂质体作为外用药物载体包封干扰素，但干扰素脂质体用药后与皮肤或粘膜不能牢固结合而发挥疗效，大大降低了干扰素的治疗指数。又如中国专利号 97109122.6 号发明专利提供了一种含有碘伏和脂质体的预防性药物，由于采用了碘伏，对干扰素的本身具有破坏性，同时因其具有高氧化性对脂质体也将有破坏作用，从而降低脂质体的包封率，减弱干扰素有效的生物学活性，影响干扰素的疗效。此外，中国专利号 97109123.4 号发明专利，提供了一种干扰素脂质体凝胶剂，其采用凝胶与干扰素脂质体组合，使干扰素在脱水后成为粉状，使用前需先在水中全部溶解后成为凝胶水溶液，再作为外涂药物使用。同时，该种干扰素脂质体凝胶在制备时需将赋形剂与干扰素脂质体在 0-4℃ 相混合，干燥后成为微粒粉状的干扰素脂质体凝胶剂。该发明的凝胶剂具有以下不足：1、制备工艺复杂，需要经过冻干过程，此过程将降低干扰素的活性；2、要将凝胶剂用水溶解后才能作为外涂药物使用，使用不方便。

发明内容

本发明的目的在于提供一种干扰素脂质体乳膏剂，它具有对主药干扰素有缓控释作用，药效稳定，易于均匀的涂敷于皮肤粘膜，粘附性好，且无刺激性，容易被皮肤吸收，使用方便的优点，并且本发明的乳膏，其基质配方有助于干

扰素脂质体的稳定。

根据本发明的一个方面，提供包封于脂质体中的干扰素，其中的干扰素可以是天然的或重组技术制备的干扰素，目前常见的干扰素类型均可用于本发明的乳膏剂，例如 α 型、 β 型或 γ 型的干扰素均可使用，优选使用的是 α 型干扰素，因其具有抗病毒的作用而较适于制备外用制剂。在本发明的一个具体实施方案中，使用 α 型干扰素中比活性高，抗病毒作用强，中和抗体产生率低的 $\alpha 2b$ 型干扰素制备本发明的乳膏剂。

将干扰素包封于脂质体中，它可对干扰素起到缓释和控释的作用，同时也提高了干扰素的稳定性，脂质体的脂质双分子层与生物膜有较大的相似性，并具有与组织相容性，易于组织吸收，因此促进了皮肤对干扰素的吸收。在本发明中可以使用各种类型的脂质体来包封干扰素，在本发明的一个实施方案中，使用由膜材和抗氧化剂作为制备干扰素脂质体的材料，其中所述膜材可将选自磷脂酰胆碱、大豆磷脂、脑磷脂、卵磷脂、胆固醇和硬脂酰胺的任意一种或几种联合使用，优选的是将大豆磷脂，胆固醇和硬脂酰胺联合使用，将维生素 E 作为抗氧剂来制备干扰素脂质体。

制备干扰素脂质体过程中，将一定比例的溶于 CH_2Cl_2 中的膜材和抗氧化剂进行旋转蒸发，蒸干有机溶剂后加入预定浓度的干扰素液继续进行旋转，形成包封了干扰素的脂质体悬液，超声分散后，经凝胶过滤，分部收集制得干扰素脂质体液。在本发明的实施方案中，制备脂质体的膜材和抗氧化剂的配比为：磷脂 65~90 重量份；胆固醇 5~30 重量份；硬脂酰胺 0.5~5 重量份；以及维生素 E 0.2~2 重量份，在一个优选的实施例例中，上述膜材和抗氧化剂的配比按重量计为：大豆磷脂:胆固醇:硬脂酰胺:维生素 E = 80:18:1:1。在本发明制备的干扰素脂质体中，干扰素生物活性与制备得到的干扰素脂质体溶液的体积比为，干扰素：脂质体液 = $10^5 \sim 10^8 \text{IU}$ ：1ml，其中制备得到的干扰素脂质体的包封率不小于 80%。

根据本发明的另一个方面，提供干扰素脂质体的乳膏剂型。将本发明制备的干扰素脂质体与乳膏基质混合可制备得到本发明的干扰素脂质体乳膏。本发明的乳膏基质包含下述组分：赋形剂 200~300 重量份；乳化剂 10~30 重量份；稳定剂 5~25 重量份；防腐剂 0.5~1 重量份；其中赋形剂可选自甘油或称丙三醇、液体石蜡、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、十八醇、白凡士林、黄凡士林和

羊毛脂的一种或几种联合使用，将甘油、单硬脂酸甘油酯和白凡士林联合使用作为优选的赋形剂。其中稳定剂可选自甘露醇、蔗糖、 β -环糊精、右旋糖酐 40、海藻糖和乳酸乙酯中的一种或几种联合使用，本发明的一个优选实施例中将右旋糖酐 40 与乳酸乙酯联合使用作为稳定剂。其中防腐剂选自对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯的一种或几种联合使用，在本发明的一个实施方案中将对羟基苯甲酸乙酯作为优选的防腐剂。

在本发明的脂质体乳膏中，乳化剂不仅可起到调整产品粘度及乳化效力，使原本不能相溶的油相与水相通过乳化剂的作用形成均匀的剂型，在本发明中，乳化剂更对脂质体起到稳定的作用，减少了脂质体中干扰素的泄漏，提高了干扰素脂质体的稳定性。在本发明的实施方案中，可以使用例如聚山梨酯 20、聚山梨酯 60、聚山梨酯 80、司盘 80 或十二烷基黄酸钠中任意一种作为乳化剂，最优选的乳化剂为聚山梨酯 80，其可明显提高干扰素脂质体的稳定性，聚山梨酯 80 对脂质体的保护浓度在 2.0%~5.0%重量（聚山梨酯 80：乳膏基质）之间。在本发明的一个优选实施方案中，乳膏基质中各组分的配比按重量计为：甘油：单硬脂酸甘油酯：白凡士林：聚山梨酯 80：右旋糖酐 40：乳酸乙酯：对羟基苯甲酸乙酯 = 20：20：5：3：1：1：0.1。

本发明干扰素脂质体乳膏的制备过程中，首先制备得到干扰素脂质体溶液，除菌后备用。其次按照基质配方，分别将包括赋形剂、乳化剂的油相和包括稳定剂、防腐剂以及蒸馏水的水相融化或溶解，混匀后灭菌或除菌，再将油相和水相混合制成乳膏基质，按照预定的浓度将干扰素脂质体溶液加入乳膏基质中，搅拌均匀并进行分装，即可制得本发明的干扰素脂质体乳膏。

在制备中，干扰素脂质体溶液的体积毫升数与基质的重量克数比为 5~20：80~95。干扰素的生物活性与乳膏基质的重量比为 $5 \times 10^3 \text{IU} \sim 5 \times 10^6 \text{IU}$ ：1 克，优选为干扰素：乳膏基质 = $5 \times 10^4 \text{IU}$ ：1g 的比例。

发明的具体实施方式

下面，通过对本发明的较佳实施方式的描述，详细说明但不限制本发明。
材料来源：

α 干扰素：根据中国生物制品规程 2000 版，采用菌体发酵，柱层析系统制备 α 干扰素原液。

使用的其他试剂和材料均为市售产品。

【实施例一】干扰素脂质体乳膏制备

1、干扰素脂质体的制备

5 ①干扰素原液的稀释，取干扰素原液，用含 0.8%人血白蛋白的 PBS 稀释至干扰素的活性含量为 0.8×10^7 IU/ml，除菌过滤后备用。

 ②膜材的称量：按重量比磷脂酰胆碱:胆固醇:硬脂酰胺:维生素 E = 85:20:2:1 对以上膜材进行称量。

	磷脂酰胆碱	4.38 克	
10	胆固醇	1.04 克	
	硬脂酰胺	0.1048 克	
	维生素 E	0.0516 克	

 ③旋转蒸发：用 CH_2Cl_2 将称量好的各膜材组分在球型瓶中进行充分溶解后，补加 CH_2Cl_2 至 100 毫升，在旋转蒸发仪上，40℃ 100rpm 进行减压旋转蒸
15 发，待有机溶剂完全蒸干后，加入制备好的干扰素稀释液 100 毫升继续旋转，从而将瓶壁上的脂质膜剥离，然后收集脂质悬液。

 ④超声处理：将收集的悬液用浴式超声仪进行超声分散。

 ⑤凝胶过滤：将经过超声分散的干扰素脂质体液通过凝胶过滤柱过滤，收集第一个洗脱峰液 412 毫升，即为干扰素脂质体液。

20 ⑥将过柱后的干扰素脂质体液体经 0.22 μ 的滤膜除菌过滤，滤过液检定后备用。

2、基质的配制

按以下重量配比精确称量液体石蜡、单硬脂酸甘油酯、白凡士林、司盘 80、甘露醇、对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯。

25	①油相	单硬脂甘油酯	4213 克	
		白凡士林	1057 克	
		司盘 80	633 克	混匀
		液体石蜡	4197 克	
	②水相	甘露醇	215 克	
30		对羟基苯甲酸乙酯	21 克	

对羟基苯甲酸丙酯 21 克

蒸馏水 8398 克 混匀

③将油相、水相分别融化，经过滤、灭菌后，将油相、水相混合制成基质。

3、干扰素脂质体乳膏制备

5 按干扰素脂质体所含干扰素活性:基质为 $5.0 \times 10^4 \text{IU}:1\text{g}$ 的比例，将干扰素脂质体加入到基质中，并搅拌均匀后将其按 15 克/支进行分装。

【实施例二】干扰素脂质体乳膏制备

1、干扰素脂质体的制备

10 ①干扰素原液的稀释，取干扰素原液，用含 0.8%人血白蛋白的 PBS 稀释至干扰素的活性含量为 $1.0 \times 10^7 \text{IU/ml}$ ，除菌过滤后备用。

②膜材的称量：按重量比磷脂酰胆碱:胆固醇:硬脂酰胺:维生素 E = 80:20:1:1 对以上膜材进行称量。

	卵磷脂	4.26 克
15	胆固醇	1.06 克
	硬脂酰胺	0.0532 克
	维生素 E	0.0532 克

20 ③旋转蒸发：用 CH_2Cl_2 将称量好的各膜材组分在球型瓶中进行充分溶解后，补加 CH_2Cl_2 至 100 毫升，在旋转蒸发仪上， 40°C 100rpm 进行减压旋转蒸发，待有机溶剂完全蒸干后，加入制备好的干扰素稀释液 100 毫升继续旋转，从而将瓶壁上的脂质膜剥离，然后收集脂质悬液。

④超声处理：将收集的悬液用浴式超声仪进行超声分散。

⑤凝胶过滤：将经过超声分散的干扰素脂质体液通过凝胶过滤柱过滤，收集第一个洗脱峰液 389 毫升，即为干扰素脂质体液。

25 ⑥将过柱后的干扰素脂质体液体经 0.22μ 的滤膜除菌过滤，滤过液检定后备用。

2、基质的配制

按以下重量精确称量甘油、单硬脂酸甘油酯、白凡士林:聚山梨酯 20、右旋糖酐 40:乳酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯。

30 ①油相 单硬脂甘油酯 4196 克

	白凡士林	1047 克	
	聚山梨酯 20	631 克	混匀
	液体石蜡	4215 克	
②水相	甘露醇	208 克	
5	右旋糖酐 40	214 克	
	对羟基苯甲酸乙酯	21 克	
	蒸馏水	8414 克	混匀

③制备方法同实施例一。

3、乳膏制备

10 制备方法同实施例一。

【实施例三】干扰素脂质体乳膏制备

1、组分:

干扰素脂质体制备的材质:

15 $\alpha 2b$ 干扰素是根据中国生物制品规程 2000 版, 采用菌体发酵, 柱层析系统制备的 $\alpha 2b$ 干扰素原液, 其原液的活性不低于 $1.0 \times 10^8 \text{IU/ml}$ 。

制备脂质体的原料和配比同实施例二。

2、制备方法

①干扰素脂质体的制备

20 用大豆磷脂代替卵磷脂, 制备方法同实施例二。

②基质的配制

按其重量比, 甘油:单硬脂酸甘油酯:白凡士林:聚山梨酯 80:右旋糖酐 40:乳酸乙酯:对羟基苯甲酸乙酯= 20:20:5:3:1: 1: 0.1 进行精确称量。

①油相	单硬脂甘油酯	4200 克	
25	白凡士林	1050 克	
	聚山梨酯 80	630 克	混匀
②水相	甘油	4200 克	
	右旋糖酐 40	210 克	
	对羟基苯甲酸乙酯	21 克	
30	乳酸乙酯	210 克	

蒸馏水 8400 克 混匀

③制备方法同实施例一。

3、乳膏制备

制备方法同实施例一。

5

【实施例四】干扰素脂质体乳膏制备

1、干扰素脂质体的制备

制备方法同实施例三。

2、基质的配制

10 按下述重量精确称量甘油:硬脂酸、白凡士林、聚山梨酯 80、麦芽糖、乳酸乙酯和对羟基苯甲酸乙酯。

①油相	硬脂酸	4203 克	
	白凡士林	1047 克	
	聚山梨酯 80	633 克	混匀

15	②水相	甘油	4201 克	
		β -环糊精	213 克	
		对羟基苯甲酸乙酯	21 克	
		乳酸乙酯	206 克	
		蒸馏水	8397 克	混匀制备方法同实施例一

20 ③制备方法同实施例一。

3、乳膏制备

制备方法同实施例一

【实施例五】干扰素脂质体乳膏制备

1、干扰素脂质体的制备

脂质体膜材中以脑磷脂代替大豆磷脂，其他制备方法同实施例三。

2、基质的配制

按下述重量精确称量甘油、十八醇、单硬脂酸甘油酯、白凡士林、十二烷基硫酸钠、右旋糖酐 40、乳酸乙酯、对羟基苯甲酸乙酯。

30	①油相	单硬脂甘油酯	4212 克
----	-----	--------	--------

	十八醇	2095 克	
	白凡士林	1051 克	
	十二烷基硫酸钠	628 克	混匀
②水相	甘油	2110 克	
5	右旋糖酐 40	214 克	
	对羟基苯甲酸乙酯	21 克	
	乳酸乙酯	213 克	
	蒸馏水	8402 克	混匀

③制备方法同实施例一。

10 3、乳膏制备

制备方法同实施例一。

【实施例四】干扰素脂质体乳膏的药理及毒理性实验

1.药理学研究实验:

15 (1) 实验材料: 豚鼠, 小白鼠, 猫, 均为市售动物; 干扰素脂质体乳膏为按照实施例三制备的样品。

(2) 实验方法:

①重组人干扰素 $\alpha 2b$ 脂质体乳膏 0.6×10^4 、 1.0×10^4 、 10.0×10^4 IU/只, 每日分 2 次, 连续 7 日, 涂抹于豚鼠体表患处, 观察对豚鼠实验性单疱病毒性
20 疱疹是否有明显抑制作用; 且其强度随剂量增大而增强。

②将该乳膏 0.9×10^4 、 1.5×10^4 、 15.0×10^4 IU/只涂抹小鼠破损皮肤, 然后观察药物对其自主活动有无明显影响;

③将猫麻醉, 然后在其破损皮肤上涂抹该乳膏 0.3×10^5 、 0.5×10^5 、 5.0×10^5 IU/只, 观察药物对其血压、心率、呼吸频率、呼吸深度及心电图有无明显
25 影响。

(3) 实验结果:

药物对豚鼠实验性单疱病毒性疱疹有明显抑制作用, 且其强度随剂量增大而增强; 对小白鼠自主活动无明显影响; 对麻醉后的猫血压、心率、呼吸频率、呼吸深度及心电图无明显影响。

30 2.大鼠急性毒性试验

(1) 实验材料: 大鼠为市售动物; 干扰素脂质体乳膏为实施例三制备的样品。

(2) 实验方法: 将干扰素脂质体乳膏最大给药量 2.78×10^7 IU/kg 涂于大鼠的体表破损皮肤处, 连续观察 7 天, 记录异常现象和死亡数。

5 (3) 实验结果: 7 天内大鼠无一死亡, 亦未出现异常反应, 该剂量相当于临床剂量的 1.1×10^4 倍, 所以临床用药非常安全。

3. 长期毒性试验:

(1) 实验材料: 大鼠为市售动物; 干扰素脂质体乳膏为实施例三制备的样品, 按实施例三制备的不含干扰素的对照品。

10 (2) 实验方法: 将干扰素脂质体乳膏按 2.5×10^6 IU/只剂量于大鼠破损皮肤处给药, 每日一次, 连续 28 天 (相当于临床拟用周期的 4 倍), 与对照品比较, 观察大鼠的活动、体重、饮食量、饮水量、血常规、血生化指标、脏器系数以及进行组织病理学检查, 记录异常现象和死亡数。

(3) 实验结果: 与对照组比较, 对所观察的各指标均无明显异常。连续
15 给药 28 天后再停药观察 14 天, 上述各指标均无明显异常。

【实施例五】干扰素脂质体乳膏的安全性检查实验

1. 皮肤过敏试验:

(1) 实验材料: 豚鼠为市售动物; 干扰素脂质体乳膏为实施例三制备的
20 药品, 活性单位为 5.0×10^4 IU/g; 按实施例三制备的不含干扰素的样品为阴性对照品; 市售的 2, 4-二硝基氯代苯为阳性对照品。

(2) 实验方法: 豚鼠背部脱毛后, 其分成三, 各组分别用干扰素脂质体乳膏、阴性对照品按 0.2g/次剂量, 阳性对照品按浓度 0.1%、0.2 毫升/次进行致敏接触, 然后在 7 天和 14 天, 以同样的方法各重复一次, 再经过 14 天, 用
25 同样的剂量将受试药物、阴性对照品和阳性对照品涂于用药部位进行激发接触, 6 小时后去除, 即刻观察皮肤过敏反应情况, 然后于 24、48、72 小时再观察一次, 记录反应现象。

(3) 实验结果: 药品组和阴性对照组未见红肿、坏死等过敏反应, 阳性对照组则有明显的过敏性反应。

30 2. 皮肤刺激性试验:

(1) 实验材料: 豚鼠为市售动物; 干扰素脂质体乳膏为实施例三制备的药品, 活性单位为 $5.0 \times 10^4 \text{IU/g}$ 。

(2) 实验方法: 依照《新药(西药)临床研究指导原则汇编》, 中华人民共和国卫生部药政局, 1993年7月, 205页方法和王北婴的《中药新药研制与申报》, 中国中药出版社出版, 262页的方法进行实验。

(3) 实验结果: 干扰素脂质体乳膏按 $5.0 \times 10^4 \text{IU/g}$, 1.0g/次剂量, 连续7日涂抹皮肤, 对豚鼠完整皮肤和破损皮肤无刺激性反应。

【实施例六】干扰素脂质体乳膏的主要药效学实验

对单疱病毒性疱疹的影响:

(1) 实验材料: 豚鼠为市售动物; 干扰素脂质体乳膏为实施例三制备的, 活性单位分别为 $0.3 \times 10^4 \text{IU/g}$ 、 $0.5 \times 10^4 \text{IU/g}$ 、 $5.0 \times 10^4 \text{IU/g}$ 三个剂量的药品, 阳性对照药为阿昔洛韦软膏, 上海通用药业股份有限公司生产; 病毒为单纯疱疹病毒, 由吉林大学基础医学院病原生物学教研室提供。

(2) 实验方法: 依照《新药(西药)临床研究指导原则汇编》, 中华人民共和国卫生部药政局, 1993年7月, 169页的方法进行实验。

(3) 实验结果:

①接种病毒后 6—8 天, 在接种处发生一硬性丘疹、大泡或不规则的散在性水疱, 模型成功。

②给药后 1—2 天, 各给药组与模型组比较病情好转程度无明显差异。干扰素脂质体乳膏具有明显缩短单疱病毒性疱疹病程, 加快水疱结痂、愈合的作用。

③与阳性对照药比较, 干扰素脂质体乳膏能较长时间滞留于病损部位, 抗单疱病毒性疱疹作用更强。

【实施例七】聚山梨酯 80 对干扰素脂质体稳定性试验

1. 试验材料:

聚山梨酯 80: 药用级, 广东省肇庆市超能实业有限公司

干扰素脂质体原液: 按照前述方法制备, 干扰素活性为 $6.2 \times 10^6 \text{IU/ml}$

PBS: 磷酸盐缓冲液, 浓度为 0.1M, pH 为 7.2

脂质体裂解剂: 0.04%Triton X-100 的 PBS

722 型光栅分光光度计: 上海第三分析仪器厂

倒置显微镜: 型号: CK2, 日本 OLYMPUS 公司

2.试验方法:

5 用 PBS 将脂质体干扰素 60 倍稀释, 使其活性为 1.0×10^5 IU/ml

用 PBS 将聚山梨酯 80 稀释成浓度为 1%、2%、5%、10%溶液

取 6 只试管, 分别加入稀释后的脂质体各 2ml, 分别标 1~6 号备用

1~4 号试管中分别加入稀释好的不同的聚山梨酯 80 溶液各 2ml, 使聚山梨酯 80 的终浓度分别为 0.5%、1%、2.5%、5%

10 5 号、6 号加入 PBS 和裂解液各 2ml 阴性和阳性对照, 6 号管中 Triton X100 的终浓度为 0.02%

各样品分别在 40℃水浴中作用 5 分钟, 用 722 型光栅分光光度计测定 OD 值, 测定波长为 600nm

分别取部分 40℃水浴过的样品进行活性测定

15 干扰素的生物学活性采用微量细胞病变抑制法

3.试验结果:

样品编号	聚山梨酯 80 终浓度 (%)	OD 值	生物学活性 (IU/ml)
1	0.5	0.210	1.98×10^4
2	1	0.208	1.18×10^4
3	2.5	0.203	0.65×10^4
4	5	0.212	0.69×10^4
5	阴性对照	0.211	1.76×10^4
6	阳性对照	0.012	4.05×10^4

4.结论:

从测得的 OD 值数据可以看出, 加入不同浓度聚山梨酯 80 的脂质体溶液测定的 OD 值与阴性对照的 OD 值基本一致, 说明聚山梨酯 80 没有使脂质体裂解。而阳性对照测定的 OD 值明显很低, 说明终浓度为 0.02%TritonX-100 的 PBS 溶液可以使低浓度的脂质体裂解。

从活性的测定结果来看，随着聚山梨酯 80 浓度的提高，脂质体溶液中游离的干扰素活性降低，但含有 2.0%~5.0%重量的聚山梨酯 80（聚山梨酯 80：基质）的脂质体溶液，其游离干扰素活性的变化不明显，说明聚山梨酯 80 对脂质体的保护浓度在 2.5%左右。

- 5 总之，不大于 5%的聚山梨酯 80 对脂质体不但没有破坏作用，反而对脂质体有稳定性作用，即减少了脂质体中干扰素的泄露。

工业应用性

- 10 本发明脂质体包封的干扰素，它具有包封率高，且制剂工艺稳定，制品均一性好，药效稳定，泄露率低的优点。采用干扰素脂质体与基质制备成乳膏剂型，能够提高脂质体包封性，提高干扰素活性和药效，同时具有制备简单，使用方便的优点。在基质中采用聚山梨酯 80 作为乳化剂，对于干扰素脂质体不但没有破坏作用，反而对脂质体有稳定作用，可减少脂质体中干扰素的泄露，提高干扰素脂质体的稳定性，提高干扰素的药效。本发明制备的重组人干扰素 $\alpha 2b$
- 15 脂质体乳膏可治疗由病毒感染引起的皮肤病，如带状疱疹、疱疹性口炎、疣、尖锐湿疣、染性软疣、外生殖器疱疹、扁平疣、寻常疣、生殖器溃疡、口疮及瘙痒等。同时，本发明的乳膏具有易于均匀的涂敷于皮肤粘膜，粘着性好，且无刺激性，更易被皮肤吸收，使用方便的优点。

- 20 以上对本发明的详细描述并不限制本发明，本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变和变形，只要不脱离本发明精神，这些改变和变形均应属于本发明的权利要求所定义的范围。

权利要求书

1. 一种干扰素脂质体乳膏，包含下述组分：

包封于脂质体中的干扰素；以及

乳膏基质。

2. 权利要求 1 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于其中所述干扰素以活性质量比计，含量为 $0.1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^8 \text{IU/克}$ 制剂；所述制剂中干扰素生物活性与乳膏基质的重量比为： $5 \times 10^3 \text{IU} \sim 5 \times 10^6 \text{IU} : 1 \text{克}$ ；在包封率大于 80% 的情况下，所述包封于脂质体中的干扰素的生物活性与脂质体液的体积比为，干扰素：脂质体 = $10^5 \sim 10^8 \text{IU} : 1 \text{ml}$ 。

3. 权利要求 2 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述制剂中干扰素生物活性与乳膏基质的重量比为： $5 \times 10^4 \text{IU} : 1 \text{克}$ 。

4. 权利要求 1 或 2 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述包封干扰素的脂质体由下述组分制得：

膜材，所述膜材选自磷脂酰胆碱、大豆磷脂、脑磷脂、卵磷脂、胆固醇和硬脂酰胺的一种或几种；以及

抗氧化剂。

5. 权利要求 4 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述脂质体由下述组分制得：

磷脂	65 ~ 90 重量份；
胆固醇	5 ~ 30 重量份；
硬脂酰胺	0.5 ~ 5 重量份；以及
维生素 E	0.2 ~ 2 重量份。

6. 权利要求 5 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述脂质体由下述按重量比计组分制得：

磷脂:胆固醇:硬脂酰胺:维生素 E = 80:18:1:1。

7. 权利要求 1 或 2 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述乳膏基质含有：

赋形剂	200 ~ 300 重量份
乳化剂	10 ~ 30 重量份

稳定剂 5 ~ 25 重量份

防腐剂 0.5 ~ 1 重量份

其中所述赋形剂选自甘油、液体石蜡、硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、十八醇、白凡士林、黄凡士林和羊毛脂的一种或几种；

5 所述乳化剂为聚山梨酯 20、聚山梨酯 60、聚山梨酯 80、司盘 80 或十二烷基磺酸钠；

所述稳定剂选自甘露醇、蔗糖、麦芽糖、右旋糖酐 40、海藻糖和乳酸乙酯的一种或几种；

10 所述防腐剂选自对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯的一种或几种。

8. 权利要求 7 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述乳化剂为聚山梨酯 80。

9. 权利要求 8 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述制剂中聚山梨酯 80：乳膏基质 = 2.0%~5.0%重量。

15 10. 权利要求 9 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述乳膏基质包括以重量比计：

甘油：单硬脂酸甘油酯：白凡士林：聚山梨酯 80：右旋糖酐 40：乳酸乙酯：对羟基苯甲酸乙酯 = 20:20:5:3:1: 1: 0.1。

20 11. 权利要求 1 或 2 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述干扰素为天然的或基因重组的人干扰素 α 、 β 、 γ 的任一型别。

12. 权利要求 11 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述干扰素为 $\alpha 2a$ 、 $\alpha 1b$ 或 $\alpha 2b$ 型干扰素。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷:A61K9/127,38/21,A61P31/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷:A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese patent

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI;EPODOC;PAJ;CPRS;CA;CNKI


Key words: interferon,liposome,ointment,milk,etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US5853755A(PharmaDerm Laboratories Ltd.),29.DEC.1998(29.12.98), whole	1-4
A	CN1200942A(DIPU BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO LTD WUHAN)09.DEC.1998(09.12.98), whole	1-12
A	TIANJING PHARMACEUTICAL,vol.14,no.6,published in DEC.2002,Yang Xinjian et al., "The preparation of the dermal formulation of the interferon liposome ",p 42-43	1-12
A	RU2176518A(GAPONYUK P P)10.DEC.2001(10.12.01),abstract	1-12
A	WO03030865A1(CHO Y W)17.APR.2003(17.04.03),abstract	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02.SEP.2004(02.09.04)	Date of mailing of the international search report 16 · SEP 2004 (16 · 09 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer  Telephone No. (86-10)62085232

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000803

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP1290634A(HARUTSUGU TSUCHIYA)22.NOV.1989(22.11.89),abstract	1-12
A	JP6228012A(DAI ICHI SEIYAKU CO LTD)16.AUG.1994(16.08.94),abstract	1-12
A	JP62283934A(HITAMIN KENKYUSHO:KK)09.DEC.1987(09.12.87) , abstract	1-12
A	CN1200941A(DIPU BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO LTD WUHAN)09.DEC.1998(09.12.98),whole	1-12

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/000803

A. 主题的分类

IPC⁷:A61K9/127,38/21,A61P31/12

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷:A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI;EPODOC;PAJ;CPRS;CA;CNKI

检索词: 干扰素, 脂质体, 软膏, interferon, liposome, ointment, milk 等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US5853755A(PharmaDerm Laboratories Ltd.),29.12 月 1998(29.12.98), 全文	1-4
A	CN1200942A(武汉迪普生物技术有限公司)09.12 月 1998(09.12.98), 全文	1-12
A	天津药学, 第 14 卷第 6 期, 2002 年 12 月出版, 杨新建等, “皮肤外用干扰素脂质体的制备”, 第 42-43 页	1-12
A	RU2176518A(GAPONYUK P P)10.12 月 2001(10.12.01),摘要	1-12
A	WO03030865A1(CHO Y W)17.4 月 2003(17.04.03),摘要	1-12

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

02.9 月 2004(02.09.04)

国际检索报告邮寄日期

16.9月2004(16.09.2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085232

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	JP1290634A(HARUTSUGU TSUCHIYA)22.11 月 1989(22.11.89),摘要	1-12
A	JP6228012A(DAI ICHI SEIYAKU CO LTD)16.8 月 1994(16.08.94),摘要	1-12
A	JP62283934A(BITAMIN KENKYUSHO:KK)09.12 月 1987(09.12.87),摘要	1-12
A	CN1200941A(武汉迪普生物技术有限公司)09.12 月 1998(09.12.98),全文	1-12